第12卷 第1期
1991年2月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 12, No. 1
Feb., 1991

酶标免疫分析法鉴定蛇毒

葛 兵 俞慧群 汪静英
（中国科学院上海生化所）

许 燕
（中国科学院合肥智能所）

摘　要

蛇伤的治疗与蛇伤种类的快速诊断密切相关。我们用亲和层析法纯化了三种蛇毒的抗体Fab，它们之间无免疫交叉反应。然后用高碘酸钠法将辣根过氧化物酶标记到抗体Fab上。我们建立的三夹心式酶标免疫测定蛇毒的方法，可在90分钟内检测到5毫微克以下的蛇毒，人体血清对该测定无干扰现象，临床检测效果良好。

关键词： 蛇毒，蛇伤，酶标免疫测定

蛇伤的蛇种快速鉴定对病人及时有效治疗有着重要的作用。近年来，国外关于蛇伤的蛇种诊断已有报道，如放射免疫测定法（Sutherland, 1977）、酶联免疫分析法（Coulter, 1980）等。但这些方法测定耗时长，仪器要求高，以及酶标抗体之间有免疫交叉反应。国内报道的对流免疫电泳法、乳胶凝集抑制法（李云龙等，1982）也不够理想，不宜临床使用。

五步蛇、蝮蛇和银环蛇是我国江浙一带常见的毒蛇，我们用无免疫交叉反应的这三种蛇毒的抗体Fab制成辣根过氧化物酶（HRP）酶标Fab，并用三夹心法测定蛇毒，效果较佳，灵敏快速，结果较为满意。

材 料 与 方 法

五步蛇毒、蝮蛇毒、银环蛇毒和竹叶青蛇毒由祁门蛇伤所提取制备。抗五步蛇毒、抗蝮蛇毒和抗银环蛇毒抗体Fab由上海生物制品所制备。小牛血清购自金华清湖犊牛种用研究站。辣根过氧化物酶购自上海生化所东风厂。其它常用试剂均为国产分析纯。

无免疫交叉反应的抗体Fab的纯化：按吉鑫松等人的方法（Ji Xin Song *et al*.,

本文1989年5月12日收到，同年8月18日修回。

1984）制备五步蛇毒，竹叶青蛇毒和蝮蛇毒-Sepharose 4B（每ml抽干的Sepharose 4B加5mg蛇毒）。然后装成柱（1.2×8cm）用含0.5*M* NaCl的0.05*M* pH7.95 Tris-HCl缓冲液平衡，将60—80OD_{280}的Fab通过柱，流出的就是所要的Fab。蝮蛇毒抗体Fab通过五步蛇毒-Sepharose 4B柱和竹叶青蛇毒-Sepharose 4B柱；五步蛇毒抗体Fab通过蝮蛇毒-Sepharose 4B柱。

酶标抗体Fab的制备：按Boorsma方法（Boorsma *et al*., 1979）制备HRP-Fab，只是所用Ultragel AcA-44柱为1×46cm，流速为1 ml/小时。

酶标测定蛇毒：1）将抗体Fab稀释到最适浓度6—12 mg/L，所用溶液为0.05*M* pH 9.6碳酸缓冲液，酶标板每孔加0.1 ml，5℃放置过夜。次日用水洗涤后，胶带封口，冰箱中放置备用。2）接有抗体Fab的孔中加0.1 ml蛇毒液，溶液系统为0.05*M* pH 7.2的磷酸缓冲液，含0.9% NaCl、0.05% Tween-80和10%小牛血清。37℃保温30分钟后，用相同缓冲液洗涤三次。3）加0.1 ml含酶标抗体的上述缓冲液，37℃保温30分钟，洗涤三次。4）加0.1 ml HRP活力测定反应液（3.5mg 4-氨基安替吡啉、1 ml 3%酚水溶液和20 ml 0.2*M* pH 7.0磷酸缓冲液。混匀后加25μl 3% H_2O_2，混匀即可）。37℃保温30分钟，用酶标测定仪测定500nm光吸收。

结 果 与 讨 论

蛇毒抗体Fab的纯化

用琼脂板免疫扩散沉淀实验发现，蛇毒抗体Fab除与自身对应的蛇毒有反应外，五步蛇毒抗体Fab与蝮蛇毒、竹叶青蛇毒有沉淀反应；蝮蛇毒抗体Fab与五步蛇毒、竹叶青蛇毒有沉淀反应。后来的酶标测定实验也证实了这个结果。因而，要准确地鉴定蛇毒，必须先除去交叉免疫反应的抗体。要达到此目的，最有效的方法就是亲和层析。

将五步蛇毒抗体Fab过蝮蛇毒-Sepharose 4B柱，流出的抗体Fab与蝮蛇毒无免疫反应。巧合的是，它与竹叶青蛇毒亦无反应。此层析的回收率为60%—70%，即原液中有交叉反应的抗体Fab占30%。

蝮蛇毒抗体Fab过五步蛇毒-Sepharose 4B柱。流出的抗体Fab与五步蛇毒无免疫反应，但与竹叶青蛇毒还有反应。因而再通过竹叶青蛇毒-Sepharose 4B柱层析，最后得到的抗体与五步蛇毒和竹叶青蛇毒皆无免疫反应。每步回收为70%左右。

银环蛇毒抗体Fab与其它蛇毒无免疫交叉反应。

蛇毒抗体Fab的酶标

先用高碘酸钠法和二步戊二醛法两种方法，将HRP标记到蛇毒抗体Fab上，并对其进行比较，表1是HRP标记五步蛇毒抗体Fab的结果。用高碘酸钠法进行酶标，Fab基本上能全部被标记，Fab游离分子很少，所以产物的HRP:Fab较低为0.25—0.30。而用戊二醛法标记，HRP:Fab则为1。这是因为所得产物中有大量的自由Fab存在，以及交联的聚HRP分子。尽管二步戊二醛法HRP酶活力回收较高碘酸钠法为高，但二者的总效价相近。由于高碘酸钠法操作简便，条件易控制，所用时间短，因而我们在后面的实验中都采用此法进行酶标。

表 1　两种方法酶标的结果*

酶标方法	原料总量 (mg)		效价	产物总量 (mg)		酶活力回收 (%)	HRP/Fab
	HRP	Fab		HRP	Fab		
高碘酸钠法	4	3	×128	0.35	1.2	15	0.28
	4	3	×256	0.49	1.9	29	0.26
戊二醛法	10	3	×128	2.2	2.4	37	0.99
	10	3	×128	3.9	2.3	61	1.2

* 表中HRP量和Fab量分别根据 $E_{280}^{1\%}=13.7$，$E_{403}^{1\%}=4.4$ 和 $E_{280}^{1\%}=6.76$ 计算得到。

酶标免疫法测定蛇毒

常规酶标免疫法测定抗原，通常是首先将待测的抗原非特异地吸附在酶标板上，然后再与酶标抗体作用，最后测酶活力。但如果要将此法用到临床测定蛇毒上，有两个致命弱点：第一，非特异地吸附蛇毒，耗时太长，需要过夜（需十多小时）。第二，酶标板吸附蛇毒是非选择性，因而也会同时吸附血液和组织液中其它蛋白质，这样就影响了待测蛇毒蛋白的吸附，使测定灵敏度降低以致测不到。因为蛇毒蛋白相对于血液中蛋白而言极少。

为此，建立了三夹心(Sandwich)结构酶标免疫方法测定蛇毒。其方法如图 1 所示：

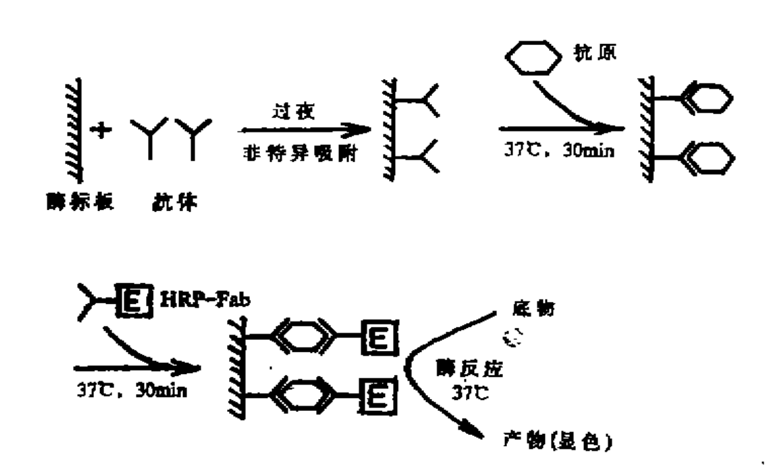


图 1　三夹心结构酶测定蛇毒示意图

第一步非特异吸附抗体Fab 分子，然后洗涤、吸干，用胶带封口，冰箱中保存备用。当有待测样品时，取出酶标板，加入蛇毒，37℃保温30分钟，洗涤，再加入HRP-Fab，37℃保温30分钟，洗涤。加酶反应液，37℃保温，最后测 OD_{500}。这样从加蛇毒到得到结果一般<90分钟（蛇毒量大，时间则更短）。在此方法中，吸附蛇毒是特异吸附，血液中其它蛋白质没有干扰。

三夹心法测定灵敏度与第一步所用的Fab量有关，表2是固定蛇毒量（40μg）、HRP-Fab量和保温时间后，所用Fab浓度与最后酶反应显色OD_{500}值的关系。从表2中可见Fab浓度在6—12 mg/L时，其测定灵敏度为最高。这是因为抗体浓度低时，与抗原结合的位点少；抗体浓度过高时，抗体之间的空间位阻大，影响了与抗原的结合。我们在临床测定中皆采用6—12 mg/L的最佳抗体Fab浓度。

表2 Fab浓度与测定灵敏度的关系

Fab \ Fab浓度(mg/L) \ OD_{500}	3	6	13	26	52	105	210
抗五步蛇毒抗体	0.53	0.62	0.66	0.47	0.46	0.45	0.36
抗蝮蛇毒抗体	0.60	0.68	0.83	0.73	0.64	0.67	0.34
抗银环蛇毒抗体	0.76	0.82	0.77	0.60	0.50	0.34	0.28

表3是常规酶标法与三夹心酶标法的结果比较：

表3 二种酶标测定方法结果比较

	灵敏度(Ag)	测定需时间(小时)	血液干扰	临 床
常规方法	<5 ng	10	有	不能使用
三夹心方法	<5 ng	1.5	没有	可使用

临床试验

将三夹心酶标测定蛇伤作了临床试验。具体过程是：酶标板上1、2、3号孔已事先分别吸有抗五步蛇毒、抗蝮蛇毒和抗银环蛇毒抗体Fab，每孔加含病人血液组织液的缓冲液0.1 ml（在病人伤口附近取血液组织液10—20 μl稀释到0.3 ml），37℃保温30分钟。洗涤三次，再对应地加不同蛇毒的HRP-Fab，37℃保温30分钟，洗涤。加0.1 ml酶反应液，37℃保温30分钟。观察各孔显色情况，如果1号孔显色说明病人是五步蛇蛇伤；2号孔显色是蝮蛇伤；3号孔显色是银环蛇伤。

我们在祁门蛇伤所的帮助下，做了十例临床试验。结果表明：（1）此方法没有出现假阳性现象，这是由于抗体抗原作用的高度专一性所决定的。但会出现假阴性结果，如病人被咬伤两天后才取样（在此情况下，一般病人伤口已用中草药处理过），以及取样量太少。（2）蝮蛇蛇伤测定最后一步酶显色反应要30分钟才有明显的红颜色产生，而五步蛇蛇伤一般只需2—7分钟。这是因为五步蛇毒量大，而且是血液毒素。（3）因为没有银环蛇蛇伤病人，我们没有做此类蛇伤测定。表4是临床试验结果。

总之，三夹心式酶标免疫测定蛇毒方法，测定灵敏，条件简单，需时少，一般乡村医院都可进行。

表 4　酶标法测定蛇毒临床使用结果

病　人	酶 标 测 定 显 色（即蛇种）			备　　注
	五步蛇	蝮　蛇	银环蛇	（其它方法诊断结果）
1	－	+	－	蝮蛇伤
2	+ +	－	－	五步蛇伤
3	+ +	－	－	五步蛇伤
4	－	－	－	蝮蛇伤*
5	－	－	－	眼镜蛇伤
6	+ +	－	－	五步蛇伤
7	－	+	－	蝮蛇伤

* 此病人被咬伤后，当即用中草药处理伤口，两天后才送到医院进行测定及治疗。

参 考 文 献

李云龙等　1982　中华医学杂志，62：709。

Boorsma, D. M. *et al.* 1979 *J. Immuno. Meth.* 30: 245.

Coulter, A.R. 1980 *Med. J. Aust.* 3: 433.

Ji Xin Song *et al.* 1984 *Enzyme Engineering* 7: 264.

Sutherland, S. K. 1977 *Med. J. Aust.* 2: 177.

A SANDWICH ENZYME-IMMUNOASSAY FOR DETECTING SNAKE VENOM

Ge Bing　Yu Huiqun　Wang Jingying

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

Xu Yan

(The Institute of Intelligent Machines, Academia Sinica)

The rapid identification of snake venom in snakebite is very helpful to the treatment of the snakebite. We have purified three kinds of antibody Fab of snake venoms by affinity chromatography on different immobilized snake venom, in order to avoid crossimmunoreaction. Horseradish peroxidase was coupled to these Fab fragments by the periodate method. We have developed a sandwich enzyme-immunoassay, which is capable of detecting $<$ 5 ng of snake venom in about 90 minutes. This assay used in clinical identification of snake venom has achieved satisfied results.

Key words: Snake Venom, Snakebite, Enzyme-immunoassay